CE

FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Inhibin α
Clone R1
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IS058

English

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Anti-Human Inhibin α, Clone R1 (1), Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. This antibody is useful for the identification of ovarian tumors such as ovarian sex cord-stromal tumors (SCST). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Summary and explanation

Inhibin is a dimeric glycoprotein hormone comprised of an α and ß subunit. It is a member of the transforming growth factor-ß (TGF-ß) superfamily and inhibits the production or secretion of pituitary gonadotropins, preferentially follicle-stimulating hormone (FSH) (2,3). Inhibin with activin, a closely related dimeric glycoprotein hormone comprised of two ß-subunits, create a fine-tuned endocrine feedback loop. Inhibin decreases, while activin increases, the biosynthesis and release of FSH. Inhibin and activin have been demonstrated to be present in a variety of gonadal and nongonadal tissues, indicating that these peptides have other functions in addition to regulating FSH secretion. Inhibin antagonizes the action of activin in many systems, which may be a property valid in tumorigenesis. It is also thought that inhibin may act as a gonadal tumor suppressor, while activin may promote tumor growth via an autocrine loop (2).

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Ready-to-use monoclonal antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L NaN_3.

Clone: R1 Isotype: IgG2a, kappa

Specificity

Anti-inhibin α, clone R1 is directed against the 1–32 amino acid sequence of the human inhibin α subunit. Clone R1, according to inhibition results from radioimmunoassays, demonstrates a much greater preference for human 1–32 than for bovine (73 fold) or porcine (23 fold) peptides. The antibody also reacts with some of the multiple molecular forms of inhibin found in both bovine and human follicular fluids (1).

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation including materials required but not supplied

The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012/K8014).

Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide.

Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012/K8014). The following parameters should be used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 °C; epitope retrieval temperature and time: 97 °C for 20 (±1) minutes; cool down to 65 °C. Rinse sections with diluted room temperature EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012).

Paraffin-embedded sections: As alternative specimen preparation, both deparaffinization and epitope retrieval can be performed in the PT Link using a modified procedure. See the PT Link User Guide for instructions. After the staining procedure has been completed, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Dako Silanized Slides (Code S3003) is recommended.

Staining procedure including materials required but not supplied

The recommended visualization system is EnVision™ FLEX+, Mouse High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: FLEXRTU2 (200 uL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 uL dispense volume)

Autoprogram (without counterstaining): Inhibin or Autoprogram (with counterstaining): InhibinH

The Auxiliary step should be set to “rinse buffer” in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to “none.” This ascertains comparable wash times.

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator’s Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Services.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol. Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in “Performance characteristics.”

Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). Non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include both the leydig cells, sertoli cells and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in “Performance characteristics” in all positive specimens. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS750).

Staining interpretation

The cellular staining pattern is cytoplasmic.

Performance characteristics

Normal tissues: Inhibin α expression as determined by immunohistochemistry is found in the majority of gonadal sex-cord stromal elements. Immunoreactive elements include follicular granulosa cells and theca interna of the ovary, testicular Sertoli and Leydig cells and luteinized stromal-thecal and hilar cells (2). Anti-inhibin α, clone R1 demonstrated strong immunoreactivity in the zona reticularis of normal adrenal cortex, weaker immunoreactivity in the zona fasciculata and was unreactive with cells of the zona glomerulosa (4). In normal breast tissue, inhibin α expression was observed in ductal and lobular epithelial cells but not in myoepithelial cells (5). Also positive by immunohistochemistry are pituitary somatotrophs (6). No positive immunostaining has been observed in any pancreatic or gastrointestinal endocrine cell including cells of the fundus, antrum, duodenum, jejunum, ileum, appendix and rectum (6).

Abnormal tissues: Inhibin α expression in hyperplastic adrenal cortex was strongly positive in zona reticularis, weakly positive in zona fasciculata, and negative in zona glomerulosa as well as in adrenal medullary cells. In adrenocortical adenomas, inhibin α expression was weak and focal, but strong in all virilizing tumors. Inhibin α expression was variable in adrenocortical carcinomas regardless of hormonal activity, being either strongly positive or completely negative—therefore, overall, zone specific expression of inhibin α was high in androgen producing adrenocortical cells (4). In abnormal breast tissues, anti-inhibin α demonstrated moderate to strong positive immunoreactivity in the epithelial cells of benign neoplasms, intense positive immunoreactivity in apocrine epithelial cells of fibrocystic disease, and weak to moderate positive immunoreactivity in epithelial neoplastic cells as well as positive immunoreactivity in endothelial cells of malignant lesions (5). One case of granulosa cell tumor of the central nervous system (CNS) demonstrated positive reactivity with anti-inhibin α, clone R1. In seventy endocrine tumors from various sites in the gastroentero-pancreatic system, positive immunoreactivity with anti-inhibin α, clone R1 was found in rare cells in seven of the seventy tumors. Positive

immunoreactivity was demonstrated in one of one G cell gastinoma of the duodenum and one of two G cell gastinomas of the pancreas, in two of three VIPomas of the pancreas, in one of one undefined cell tumor of the jejunum and pancreas, and in one of one A/D cell tumor of the pancreas. Otherwise, anti-inhibin α demonstrated negative immunoreactivity in the remainder of tumors tested in the duodenum and pancreas, as well as the appendix, ileum, rectum, right colon and stomach of various cell types (6).

In abnormal ovarian tissues, inhibin α has been demonstrated to be a sensitive marker for the majority of SCSTs. Based on a survey of current literature (2), immunoreactive inhibin α is present in nearly 100% of tumor cells in granulosa cell tumors, Leydig cell tumors, Sertoli-Leydig cell tumors, Sertoli cell tumors, steroid cell tumors, sex cord tumors, and gynadroblastomas. Anti-inhibin α stains the sex cord elements of gonadoblastomas and unclassified sex cord-stromal tumors with a few exceptions. However, the Sertoli cell component in SCSTs was occasionally reported as negative for inhibin α expression. Inhibin α is also expressed in a majority of luteinized stromal cells or theca-lutein-like cells in thecomas, fibrothecomas, stromal luteomas, fibromas, sclerosing stromal tumors, stromal hyperplasias, and hypertheocosis. Expression of inhibin α has also been observed in luteinized stromal or leca-lutein-like cells within the stroma of ovarian epithelial tumors and ovarian metastatic carcinomas (2). When testing various ovarian abnormal tissues with ant-inhibin α, clone R1, immunoreactivity was demonstrated in seventy-seven out of eighty granulosa cell tumors, all twelve Sertoli-Leydig tumors, both retiform subtype of Sertoli-Leydig cell tumors, both Sertoli tumors, both gynadroblastoma, nine of the eighteen thecomas and all six steroid cell tumors (3,7). Fifteen out of sixteen cases of testicular sex cord- stromal tumor tested with inhibin α, R1 demonstrated positive immunoreactivity (2). All fibromas, myxomas, sclerosing stromal tumors, various carcinomas, germ cell tumors, small cell carcinomas, lymphomas and malignant tissue of poorly differentiated prostate cancer demonstrated negative tumor immunoreactivity with anti-inhibin α antibodies (3,7,8).

Français

Réf. IS058

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique *in vitro.*

FLEX Monoclonal Anti-Human Inhibin α, clone R1 (1), Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus. Cet anticorps est utile pour l'identification des tumeurs ovariennes telles les tumeurs stromales du cordon sexuel (SCST). L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Résumé et explication

L'inhibine est une hormone glycoprotéine dimère composée d'une sous-unité α et ß. Elle fait partie de la superfamille des facteurs de croissance transformant-ß (TGF-ß) et elle inhibe la production ou la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires, de préférence l'hormone folliculostimulante (FSH) (2,3). L'inhibine avec l'activine, une hormone glycoprotéine dimère très proche composée de deux sous-unités ß, crée une boucle de retour d'endocrine réglée de manière précise. L'inhibine diminue la biosynthèse et la libération de la FSH tandis que l'activine l'augmente. L'inhibine et l'activine sont présentes dans divers tissus gonadiques et non gonadiques, indiquant que ces peptides ont d'autres fonctions en plus de la régulation de la sécrétion de la FSH. L'inhibine est un antagoniste de l'action de l'activine dans de nombreux systèmes, une propriété qui peut s'avérer intéressante dans la tumorigenèse. On pense aussi que l'inhibine agit comme un suppresseur des tumeurs gonadiques, alors que l'activine peut favoriser la croissance tumorale via un processus de boucle autocrine (2).

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis

Anticorps monoclonal prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : R1 Isotype : IgG2a, kappa

Spécificité

L'anti-inhibine α, clone R1 est dirigée contre la séquence d'acides aminés 1–32 de la sous-unité de l'inhibine humaine. Le clone R1, selon les résultats d'inhibition obtenus par radio-immunoessais, démontre une préférence nettement supérieure pour la séquence 1–32 humaine que pour les peptides bovins (73 fois) ou porcins (23 fois). L'anticorps réagit également à certaines formes moléculaires multiples d'inhibine présentes à la fois dans les liquides folliculaires bovins et humains (1).

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Le prétraitement avec un démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8012/K8014).

Coupes déparaffinées : Le pré-traitement des coupes de tissus déparaffinés fixés au formol et inclus en paraffine est recommandé à l'aide du Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link.

Suivre la procédure de pré-traitement indiquée dans la notice pour la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8012/K8014). Les paramètres suivants doivent être utilisés pour le PT Link : Température de préchauffage : 65 °C; température et durée de restauration de l'épitope : 97 °C pour 20 (±1) minutes ; laisser refroidir jusqu'à 65 °C. Rincer les coupes avec un EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x), dilué à température ambiante (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8012).

Coupes incluses en paraffine : Comme préparation alternative des échantillons, le déparaffinage et la restauration de l'épitope peuvent être réalisés dans le PT Link à l'aide d'une procédure modifiée. Se référer aux instructions du Guide d'utilisation du PT Link. Une fois que la procédure de coloration est terminée, les coupes doivent être déshydratées, lavées et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ou lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames Dako Silanized Slides (Réf. S3003).

Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni

Le système de visualisation recommandé est le EnVision™ FLEX+, Mouse High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8012). Les étapes de coloration et d'incubation sont préprogrammées dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : FLEXRTU2 (volume de distribution de 200 µl) ou FLEXRTU3 (volume de distribution de 300 µl)

Autoprogram (sans contre-coloration) : Inhibin ou Autoprogram (avec contre-coloration) : InhibinH

L'étape Auxiliary doit être réglée sur « rinse buffer » lors des cycles de coloration avec ≤10 lames. Pour les cycles de coloration de >10 lames, l'étape Auxiliary doit être réglée sur « none ». Cela confirme des temps de lavage comparables.

Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Dako Autostainer utilisé, contacter le service technique de Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Si le pathologiste qui réalise l'évaluation désire une intensité de coloration différente, un spécialiste d'application/spécialiste du service technique de Dako peut être contacté pour obtenir des informations sur la re-programmation du protocole. Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en vérifiant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide d'hématoxyline EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). L'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Le contrôle de tissu positif doit comprendre les cellules de Leydig, ainsi que les cellules de Sertoli et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que décrits pour ces tissus dans les « Caractéristiques de performance » pour tous les échantillons positifs. Le contrôle négatif recommandé est le FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. IS750).

Interprétation de la coloration

Le schéma de coloration cellulaire est cytoplasmique.

Caractéristiques de performance

Tissus sains : L'expression de l'inhibine α telle qu'elle est déterminée par immunohistochimie est présente dans la majorité des éléments stromaux gonadiques du cordon sexuel. Les éléments immunoréactifs comprennent les cellules folliculaires de la granulosa et les cellules intrathécales de l'ovaire, les cellules testiculaires de Sertoli et Leydig et les cellules stroma-thécales et hilaires lutéinisées (2). L'anti-inhibine α, clone R1 a présenté une forte réactivité dans la zone réticulée du cortex surrénal sain, une immunoréactivité plus faible dans la zone fasciculée et aucune réactivité dans la zone glomérulée (4). Dans les tissus normaux du sein, l'expression de l'inhibine α a été observée dans les cellules épithéliales canalaires et lobulaires mais pas dans les cellules myoépithéliales (5). Les somatotropes hypophysaires sont aussi positifs par immunohistochimie (6). Aucun immunomarquage positif n'a été observé dans les cellules endocrines pancréatiques ou gastro-intestinales y compris les cellules du fundus, de l'antre, du duodénum, du jéjunum, de l'iléon, de l'appendice et du rectum (6).

Tissus tumoraux : L'expression de l'inhibine α dans le cortex surrénal hyperplasique était fortement positive dans la zone réticulée, faiblement positive dans la zone fasciculée et négative dans la zone glomérulée, ainsi que dans les cellules médullaires surrénales. Dans les adénomes adrénocorticaux, l'expression de l'inhibine α était faible et focale mais forte dans toutes les tumeurs virilisantes. L'expression de l'inhibine α était variable dans les carcinomes adrénocorticaux indépendamment de l'activité hormonale, étant soit fortement positive, soit complètement négative ; donc, globalement, l'expression de l'inhibine α spécifique à une zone était forte dans les cellules adrénocorticales productrices d'androgènes (4). Dans les tissus malins du sein, l'anti-inhibine α a présenté une immunoréactivité positive modérée à forte dans les cellules épithéliales des néoplasmes bénins, une immunoréactivité positive intense dans les cellules épithéliales apocrines de la maladie fibrokystique et une immunoréactivité positive faible à modérée dans les cellules épithéliales néoplasiques ainsi qu'une immunoréactivité positive dans les cellules endothéliales des lésions malignes (5). Un cas de cellules tumorales de la granulosa du système nerveux central (SNC) a présenté une réactivité positive à l'anti-inhibine α, clone R1. Dans 7 tumeurs endocrines de divers sites du système gastroentéro-pancréatique sur 70, une immunoréactivité positive à l'anti-inhibine α, clone R1 a été observée dans quelques rares cellules. Une immunoréactivité positive a été observée dans 1 cas sur 1 de gastrinome à cellules G du duodénum et 1 cas sur 2 de gastrinome à cellules G du pancréas, dans 2 cas sur 3 de VIPomes du pancréas, dans 1 cas sur 1 de cellule tumorale non définie du jéjunum et du pancréas et dans 1 cas sur 1 de cellule tumorale A/D du pancréas. D'autre part, l'anti-inhibine α a présenté une immunoréactivité négative au reste des tumeurs testées dans le duodénum et le pancréas, ainsi qu'à divers types de cellules de l'appendice, de l'iléon, du rectum, du côlon droit et de l'estomac (6).

Dans les tissus ovariens malins, l'inhibine α s'est révélée être un marqueur sensible pour la majorité des SCST. Sur la base de la documentation actuellement disponible (2) l'inhibine α immunoréactive est présente dans près de 100 % des cellules tumorales des tumeurs de la granulosa, des tumeurs des cellules de Leydig, des tumeurs des cellules de Sertoli-Leydig, des tumeurs des cellules de Sertoli, des tumeurs des cellules stéroïdes, des tumeurs du cordon sexuel et des gynadroblastomes. L'anti-inhibine α marque les éléments du cordon sexuel des gonadoblastomes et les tumeurs stromales du cordon sexuel non classées à quelques exceptions près. Cependant, le composant cellule de Sertoli dans les SCST a quelquefois été signalé comme étant négatif à l'expression de l'inhibine α. L'inhibine α est aussi exprimée dans la majorité de cellules stromales lutéinisées ou dans les cellules pseudo-thécales des thécomes, fibrothécomes, lutéomes stromaux, fibromes, tumeurs stromales sclérosantes, les hyperplasies stromales et les hyperthéocoses. L'expression de l'inhibine α a également été observée dans les cellules stromales lutéinisées ou pseudo-thécales dans le stroma des tumeurs épithéliales de l'ovaire et les carcinomes ovariens métastatiques (2). Lors de tests à l'anti-inhibine α, clone R1 sur divers tissus ovariens anormaux, une immunoréactivité a été observée dans 77 tumeurs de la granulosa sur 80, 12 tumeurs de Sertoli-Leydig sur 12, 2 sous-types rétiformes de tumeurs de Sertoli-Leydig sur 2, 2 tumeurs de Sertoli sur 2, 2 gynadroblastomes sur 2, 9 thécomes sur 18 et 6 tumeurs à cellules stéroïdes sur 6 (3,7). Quinze cas sur 16 de tumeurs stromales du cordon sexuel testiculaire testés avec l'inhibine α, clone R1 ont présenté une immunoréactivité positive (2). Tous les fibromes, myxomes, tumeurs stromales sclérosantes, carcinomes divers, cellules germinales tumorales, carcinomes à petites cellules, lymphomes et tissus malins de cancer de la prostate mal différenciés ont présenté une immunoréactivité tumorale négative aux anticorps anti-inhibine α (3,7,8).

Deutsch Code-Nr. IS058

Zweckbestimmung

Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Anti-Human Inhibin α, Clone R1 (1), Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper dient zur Erkennung von Eierstocktumoren, wie z. B. Keimstrang-Stromatumoren (SCST = Sex Cord Stromal Tumor) der Eierstöcke. Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit ordnungsgemäßen Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Zusammenfassung und Erklärung

Inhibin ist ein dimeres Glykoproteinhormon, das aus einer α- und ß-Untereinheit besteht. Es gehört zur Überfamilie der transformierenden Wachstumsfaktoren ß (TGF-ß) und hemmt die Produktion oder Absonderung von Hypophyse-Gonadotropinen, besonders der follikelstimulierenden Hormone (FSH) (2,3). Inhibin ergibt zusammen mit Activin, einem eng verwandten dimeren Glykoproteinhormon mit zwei ß -Untereinheiten, eine fein abgestimmte endokrine Feedback-Schleife. Inhibin vermindert die Biosynthese und Abgabe von FSH, während Activin diese steigert. Inhibin und Activin wurden in verschiedenen gonadalen und nicht-gonadalen Gewebetypen gefunden. Das deutet darauf hin, dass diese Peptide noch andere Funktionen haben als nur die Steuerung der FSH-Abgabe. Inhibin wirkt der Wirkung von Activin in vielen Systemen entgegen, was bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen kann. Zudem wird vermutet, dass Inhibin als Hemmer gonadaler Tumore wirkt, während Activin über eine autokrine Schleife (2) das Tumorwachstum fördern kann.

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Gebrauchsfertiger, monoklonaler Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L NaN_3 enthält.

Klon: R1 Isotyp: IgG2a, Kappa

Spezifität

Anti-Inhibin α, Klon R1, ist gegen die 1–32 Aminosäurensequenz der menschlichen Inhibin-α-Untereinheit gerichtet. Klon R1 zeigt laut Ergebnissen von Radioimmunassays eine deutlich höhere Präferenz für menschliche 1-32-Peptide als für Rinder- (73-fach) oder Schweinepeptide (23-fach). Der Antikörper reagiert auch mit einigen der zahlreichen molekularen Formen von Inhibin in den Follikelflüssigkeiten von Rindern und Menschen (1).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid kann auch in als ungefährlich eingestuften Konzentrationen mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer validiert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Vorbereitung der Probe und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Die Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) ist erforderlich. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8012/K8014) erzielt werden.

Entparaffinierte Schnitte: Die Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte sollte mit Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) erfolgen. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch.

Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8012/K8014) durchführen. Für PT Link sollten die folgenden Parameter verwendet werden: Vorwärmtemperatur: 65 °C; Temperatur und Zeit für

Epitopdemaskierung: 97 °C für 20 (±1) Minuten; auf 65 °C abkühlen lassen. Schnitte mit auf Raumtemperatur gebrachtem, verdünntem EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8012) abspülen.

Paraffineingebettete Schnitte: Zur Probenpräparation kann für Entparaffinierung und Epitopdemaskierung im PT Link auch ein modifiziertes Verfahren verwendet werden. Weitere Informationen siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Fixiermittels auf die Objektträger aufgebracht werden.

Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von Dako Silanized Slides (Code-Nr. S3003) empfohlen.

Färbeverfahren und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Das empfohlene Visualisierungssystem ist EnVision™ FLEX+, Mouse High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8012). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

Matrix-Protokoll: FLEXRTU2 (200 µl Abgabevolumen) oder FLEXRTU3 (300 µl Abgabevolumen)

Autoprogram (ohne Gegenfärbung): Inhibin oder Autoprogram (mit Gegenfärbung): InhibinH

Bei Färbedurchläufen mit höchstens 10 Objektträgern sollte der „Zusatz“-Schritt auf „Pufferspülgang“ eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern den „Zusatz“-Schritt auf „Keine“ einstellen. Dies gewährleistet vergleichbare Waschzeiten.

Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Färbeprotokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den Technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Falls der beurteilende Pathologe eine andere Färbungsintensität wünscht, kann ein Anwendungsspezialist oder Kundendiensttechniker von Dako bei der Neuprogrammierung des Protokolls helfen. Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem gewährleistet wird, dass das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Empfohlen wird ein nichtwässriges, permanentes Fixiermittel.

Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben getestet werden. Das positive Kontrollgewebe sollte Leydig- und Sertoli-Zellen enthalten, und die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativ-Kontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. IS750).

Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster ist zytoplasmatisch.

Leistungsmerkmale

Gesundes Gewebe: Ein Großteil der gonadalen Keimstrang-Stromaelemente weist eine durch immunhistochemische Verfahren festgestellte Inhibin-α-Expression auf. Zu den immunreaktiven Elementen gehören Follikelzellen und Theca interna der Eierstöcke, Sertoli- und Leydig-Zellen der Hoden und luteinisierte stromal-thekale und hiläre Zellen (2). Anti-Inhibin α, Klon R1, zeigte starke Immunreaktivität in der Zona reticularis der gesunden Nebennierenrinde, schwächere Immunreaktivität in der Zona fasciculata und keine Reaktivität mit Zellen der Zona glomerulosa (4). In gesundem Brustgewebe wurde die Expression der Inhibin-α-Untereinheit in duktalen und lobulären Epithelzellen, jedoch nicht in Myoepithelzellen beobachtet (5). Bei immunhistochemischen Verfahren reagierten auch Somatotrophe der Hypophyse positiv (6). Dagegen wurde eine positive Immunanfärbung bei endokrinen Pankreas- oder Gastrointestinaltraktzellen ermittelt, einschließlich von Zellen aus Fundus, Antrum, Duodenum, Jejunum, Ileum, Appendix und Rektum (6).

Pathologisches Gewebe: Die Expression der α-Untereinheit von Inhibin war bei der hyperplastischen Nebennierenrinde in der Zona reticularis stark positiv, schwach positiv in der Zona fasciculata und negativ in der Zona glomerulosa, ebenso wie in Zellen der Medulla glandulae suprarenalis. Bei Adenomen der Nebennierenrinde erwies sich die Expression der Inhibin-α-Untereinheit als schwach und örtlich begrenzt, bei allen virilisierenden Tumoren dagegen als stark. Bei Karzinomen der Nebennierenrinde wurde unterschiedliche Expression der Inhibin-α-Untereinheit festgestellt, und zwar ungeachtet ihrer hormonellen Aktivität. Diese erwies sich entweder als stark positiv oder vollständig negativ. Die zonenspezifische Expression der α-Untereinheit von Inhibin war folglich in Androgen-produzierenden Zellen der Nebennierenrinde insgesamt stark ausgeprägt (4). Bei pathologischen Brustgeweben zeigte Anti-Inhibin α eine mäßig bis stark positive Immunreaktivität bei den Epithelzellen benigner Neoplasmen, stark positive Immunreaktivität bei den apokrinen Epithelzellen der fibrozystischen Mastopathie und schwach bis mäßig positive Immunreaktivität bei epithelialen neoplastischen Zellen, ebenso wie positive Immunreaktivität bei Endothelzellen maligner Läsionen (5). Ein Fall eines Granulosazellen-Tumors des Zentralnervensystems (ZNS) zeigte positive Reaktivität mit Anti-Inhibin α, Klon R1. Bei 70 endokrinen Tumoren an unterschiedlichen Stellen im gastroenteralen-pankreatischen System wurde bei wenigen Zellen von sieben der 70 Tumoren eine positive Immunreaktivität mit Anti-Inhibin α, Klon R1,

festgestellt. Eine positive Immunreaktivität ergab sich bei einem von einem G-Zell-Gastrinom des Duodenums und einem von zwei G-Zell-Gastrinomen des Pankreas, bei zwei von drei Vipomen des Pankreas, bei einem von einem unbestimmten Tumor von Jejunum und Pankreas und bei einem von einem A/D-Zelltumor des Pankreas. Ansonsten ergab Anti-Inhibin α eine negative Immunreaktivität bei den verbleibenden getesteten Tumoren, und zwar Neoplasmen unterschiedlicher Zelltypen von Duodenum und Pankreas, ebenso wie Appendix, Ileum, Rektum, rechtem Dickdarm und Magen (6).

In pathologischen Eierstockgeweben hat sich Inhibin α als empfindlicher Marker für den Großteil von SCSTs erwiesen. Laut einer Untersuchung der aktuellen Fachliteratur (2) liegt das immunreaktive α bei fast 100 % der Tumorzellen folgender Neoplasien vor: Granulosazelltumoren, Leydig-Zell-Tumoren, Sertoli-Leydig-Zelltumoren, Sertoli-Zelltumoren,Steroidzelltumoren, Keimstrangtumoren und Gynandroblastomen. Anti-Inhibin α färbt mit wenigen Ausnahmen die Keimstrangelemente der Gonadoblastome und unklassifizierten Keimstrang-Stromatumoren an. Die Sertoli-Zellkomponente bei SCSTs wurde jedoch gelegentlich als für die Expression der Inhibin-α-Untereinheit negativ registriert. Inhibin α wird ebenfalls in der überwiegenden Anzahl luteinisierter Stromazellen oder Theca-Lutein-artiger Zellen bei Thekomen, Fibrothekomen, stromalen Luteomen, Fibromen, Stromatumoren mit sklerosierender Degeneration, Stromahyperplasien und Hyperthekose exprimiert. Eine Expression der α-Untereinheit von Inhibin wurde auch bei luteinisierten Stromazellen oder Theca-Lutein-artiger Zellen innerhalb des Stromas von Epithel-Eierstockkarzinomen und metastatischen Eierstockkarzinomen festgestellt (2). Bei Untersuchungen verschiedener pathologischer Eierstockgewebe mit Anti-Inhibin α, Klon R1, wurde bei 77 von 80 Granulosazelltumoren, 12 von 12 Sertoli-Leydig-Zelltumoren, 2 von 2 netzförmigen Untertypen der Sertoli-Leydig-Zelltumoren, 2 von 2 Sertoli-Zelltumoren, 2 von 2 Gynandroblastomen, 9 von 18 Thekomen und 6 von 6 Steroidzelltumoren Immunreaktivität nachgewiesen (3,7). Fünfzehn von 16 Fällen eines mit Inhibin α, Klon R1, getesteten testikulären Keimstrang-Stromatumors zeigten positive Immunreaktivität (2). Alle Fibrome, Myxome, Stromatumoren mit sklerosierender Degeneration, verschiedene Karzinome, Keimzelltumoren, kleinzellige Karzinome, Lymphome und maligne Gewebe schlecht differenzierter Prostatakarzinome zeigten negative Tumor-Immunreaktivität mit Anti-Inhibin-α-Antikörpern (3,7,8).

References
Bibliographie
Literaturangaben

1. Groome N, Hancock J, Betteridge A, Lawrence M, Craven R. Monoclonal and polyclonal antibodies reactive with the 1-32 amino terminal sequence of the alpha subunit of human 32K inhibin. Hybridoma 1990; 9(1):31
2. Zheng W, Lauchlan SC. Inhibin and activin: their roles in ovarian tumorigenesis and their diagnostic utility in surgical pathology practice. Applied Immuno & Mol Morph 1999; 7(1):29
3. Costa MJ, Ames PF, Walls J, Roth LM. Inhibin immunohistochemistry applied to ovarian neoplasms: a novel, effective, diagnostic tool. Human Path 1997; 28(11):1247
4. Arola J, Liu J, Heikkilä P, Voutilainen R, Kahri A. Expression of inhibin α in the human adrenal gland and adrenocortical tumors. Endo Res 1998; 24(3&4):865
5. Di Loreto C, Reis FM, Cataldi P, Zuiani C, Luisi S, Beltrami CA, Petraglia F. Human mammary gland and breast carcinoma contain immunoreactive inhibin/activin subunits: evidence for a secretion into cystic fluid. European J of Endo 1999; 141:190
6. La Rosa S, Uccella S, Billo P, Facco C, Fausto S, Capella C. Immunohistochemical localization of α- and ßA-subunits of inhibin/activin in human normal endocrine cells and related tumors of the digestive system. Virchows Arch 1999; 434:29
7. Matias-Guiu X, Pons C, Prat J. Mullerian inhibiting substance, alpha-inhibin, and CD99 expression in sex cord-stromal tumors and endometrioid ovarian carcinomas resembling sex cord-stromal tumors. Human Path 1998; 29(8):840
8. Mellor SL, Richards MG, Pedersen JS, Robertson DM, Risbridger GP. Loss of the expression and localization of inhibin α-subunit in high grade prostate cancer. J of Clin Endocrinol and Metab 1998; 83(3):969

REF Catalogue number / Référence du catalogue / Bestellnummer	Temperature limitation / Limites de température / Zulässiger Temperaturbereich	IVD In vitro diagnostic medical device / Dispositif médical de diagnostic in vitro / In-vitro-Diagnostikum	
Manufacturer / Fabricant / Hersteller	LOT Batch code / Code du lot / Chargenbezeichnung	Σ Contains sufficient for <N> tests / Contenu suffisant pour <n> tests / Inhalt ausreichend für ‚n' Ansätze	
Use by / Utiliser jusque / Verwendbar bis	Consult instructions for use / Consulter les instructions d'utilisation / Gebrauchsanweisung beachten	EC REP Authorized representative in the European Community / Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne / Autorisierter Repräsentant in der EU	

Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763

EC REP
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595

www.dako.com

PT0020/ Rev C

Edition 09/07